

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 203–211

Die Bestimmung des Chlorids in Plasma und Serum (Quecksilber [II]-Thiocyanat-Methode) mit dem Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II

Von H. Küffer, R. Richterich¹⁾, R. Kraft, E. Peheim und J. P. Colombo

Chemisches Zentrallaboratorium, Inselspital CH-3010 Bern, Schweiz und Greiner Electronic AG, CH-4900 Langenthal, Schweiz

(Eingegangen am 15. März 1974/3. Februar 1975)

1. Eine Quecksilber [II]-Thiocyanat-Methode zur Bestimmung von Chlorid in Plasma und Serum wurde für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II adaptiert. Durch Weglassen von Thiocyanat im Leerwert-Ansatz wird ein Proben- und partieller Reagenzien-Leerwert durchgeführt.
2. Der Reaktions-Ablauf wurde untersucht. Bei einer Reaktionszeit von 350–500 s liegt der lineare Meß-Bereich zwischen 30 und 130 mmol/l. Zwischen 90 und 110 mmol/l beträgt die Abweichung zwischen Ist-Wert und Soll-Wert weniger als 1%.
3. Wahrscheinlich als Folge unterschiedlicher Verunreinigungen der Reagenzien mit Chlorid-Ionen muß der Eichfaktor kontrolliert und gegebenenfalls nachkalibriert werden.
4. Hämolyse, Lipämie und Bilirubin stören nicht. Das Vorliegen von Protein hat keinen Einfluß auf den Reaktionsablauf.
5. Bei Konzentrationen um 100 mmol/l beträgt die Präzision in der Serie, ausgedrückt als Variations-Koeffizient (%), bei wäßrigen Lösungen 0,3–0,6%, bei flüssigen Kontroll-Seren 0,4–0,8% und bei lyophilisierten Kontroll-Seren 0,8–1,5%.
6. Eine Verschleppung von 150 auf 10 mmol/l ist nicht nachweisbar.

The determination of chloride in plasma and serum (mercury(II)-thiocyanate method) with the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II.

1. A mercury(II)-thiocyanate method for the determination of chloride in plasma and serum was adapted for the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II. A sample blank value and a partial reagent blank value were determined by omitting thiocyanate from the control system.
2. The course of the reaction was investigated. For a reaction time of 350–500 s, the response was linear between 30 and 130 mmol/l. Between 90 and 110 mmol/l, the deviation between the actual and the theoretical value is less than 1%.
3. The calibration must be checked and, if necessary, restandardized; this is probably due to variable contamination of the reagents with chloride ions.
4. Haemolysis, lipaemia and bilirubin do not interfere. Protein has no effect on the course of the reaction.
5. At concentrations around 100 mmol/l, the in series precision, expressed as the variation coefficient (%), is 0.3–0.6% for aqueous solutions, 0.4–0.8% for liquid control sera, and 0.8–1.5% for lyophilized control sera.
6. No carry over was detectable from samples containing 150 to those containing 10 mmol/l.

Aus der Vielzahl der bekannten photometrischen Techniken zur Bestimmung des Chlorids hat sich bis heute in der Klinischen Chemie nur die Quecksilber [II]-Thiocyanat-Methode (Rhodanid-Methode) durchsetzen können. Iwasaki et al. (1) zeigten im Jahre 1952, daß in einem Reagenz das Quecksilber [II]-Thiocyanat, Eisen-Ionen und Salpetersäure enthält, bei der Zugabe von Chlorid-Ionen Rhodanid-Ionen freigesetzt werden, die mit den Eisen-Ionen einen orangeroten Komplex bilden. Die Reaktion ist seither eingehend untersucht worden (2, 3) und gehört wegen ihrer hohen Empfindlichkeit zu den Standardmethoden der analytischen Chemie

(4–7). Ihren Eingang in die Klinische Chemie fand die Methode im Jahre 1957 als sie von Skeggs (8) für den AutoAnalyzer (Technicon) adaptiert wurde (9, 10). Für die manuelle Analytik wurden ähnliche Methoden von Schoenfeld & Lewellen (11) und von Hamilton (12) entwickelt. Clauss et al. (13) modifizierten die Technik für den Analysator C 4 (Perkin–Elmer).

Im Laufe unserer Methoden-Adaptationen für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II (GSA II) gingen wir von den Arbeiten von Schoenfeld & Lewellen (11) und Clauss et al. (13) aus. Dabei mußten eingehende Untersuchungen über die Optimierung der Reagenzien und der Prozeß-Zeit, sowie über den Linearitäts-Bereich und mögliche Störfaktoren durchgeführt werden. Wir

¹⁾ Prof. Dr. R. Richterich starb am 25. Dezember 1973 während der Fertigstellung dieser Arbeit.

berichten in dieser Arbeit über die Resultate dieser Untersuchungen, sowie über die praktischen Erfahrungen mit dieser Methode während über eines Jahres.

Material und Methoden

Chemikalien

Eisen [III]-Nitrat, Nonahydrat, p. a. (Merck Nr. 3883)
Kalium-Chlorid, puriss., p. a. (Fluka Nr. 60130)
Quecksilber [II]-Chlorid, p. a. (Merck Nr. 4419)
Quecksilber [II]-Nitrat, p. a. (Merck Nr. 4434)
Quecksilber [II]-Thiocyanat, p. a. (Merck Nr. 4484)
Salpetersäure, 65 proz. (14,50 mol/l) puriss., p. a. (Fluka Nr. 84380)

Quecksilbernitrat-Stamm-Lösung

(18,5 mmol/l). 6 g Quecksilber [II]-Nitrat und 1 ml Salpetersäure werden mit demin./dest. Wasser²⁾ auf 1 Liter gelöst. Unbeschränkt haltbar.

Gebrauchslösungen

R-1: Thiocyanat-Reagenz

(Konzentrationen, mmol/l: Eisen [III]-Nitrat 19,8, Quecksilber [II]-Chlorid 0,203, Quecksilber [II]-Nitrat 0,0740, Quecksilber [II]-Thiocyanat 2,05, Salpetersäure 29,0). 650 mg Quecksilber [II]-Thiocyanat werden bei 50–70 °C unter Rühren in etwa 900 ml demin./dest. Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 2 ml Salpetersäure, 55 mg Quecksilber [II]-Chlorid und 8 g Eisen [II]-Nitrat in dieser Reihenfolge zugegeben. Rühren, bis alles gelöst ist. 4 ml Quecksilbernitrat-Lösung zugeben und mit demin./dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Im Dunkeln und bei 4 °C mindestens 1 Jahr haltbar.

R-2: Leerwert-Reagenz

(Konzentrationen, mmol/l: Eisen [III]-Nitrat 19,8, Quecksilber [II]-Nitrat 0,0740, Salpetersäure 29,0). 2 ml Salpetersäure und 8 g Eisen [III]-Nitrat werden in einigen ml demin./dest. Wasser gelöst. 4 ml der Quecksilbernitrat-Lösung zugeben und mit demin./dest. Wasser auf 1 Liter auffüllen. Im Dunkeln und bei 4 °C mindestens 1 Jahr haltbar.

Vorgehen

Die Methode C CL 1 (Chemie, Chlorid, Methode I) ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt; es wird ein Proben- und partieller Reagenzien-Leerwert durchgeführt. Die Programmierung geht aus Abbildung 2 hervor.

²⁾ Natürliches Wasser enthält je nach Art und geologischer Lage zwischen 50 und 1000 mg/l bzw. 1,5–30 mmol/l Chlorid. Für Trinkwasser gilt in den USA eine maximal zulässige Konzentration von 250 mg/l, bzw. 7 mmol/l (Wright C. V.: Public Health Repts (1962), 77, 628–632). Für „Reagent Grade Water“ fordert die American Chemical Society (Reagent Chemicals, ec. (1961) Kenyon R. L. Amer. Chem. Soc., 3rd, ed., Washington D. C.) eine maximale Chlorid-Konzentration von 0,1 mg/l, bzw. 2,8 µmol/l. Eine solche Wasser-Qualität ist aber weder nach Ionen-Austausch noch nach Destillation mit Sicherheit zu erreichen. Außer einem Carryover von Chlorid bei Destillation (Henry J. R., zit. and Winstead M: Reagent Grade Water (1967) Amer. Soc. Med. Technol., Austin Tex.: Steck), ist auch mit einer Kontamination aus der Luft zu rechnen (Bergmann J. G. & Sanik J. (1957): Analyt. Chem. 29, 241–243). Wir empfehlen daher für die Herstellung der Reagenzien zur Chlorid-Bestimmung sowie als Verdünnungs-Flüssigkeit (Dosierer Nr. 100, 99 und 97) Wasser zu verwenden, das zuerst entionisiert und anschließend quartz-destilliert wurde (demin./dest. Wasser). Die spezifische Leitfähigkeit sollte unter 0,2 µS liegen.

	REAGENT	DISPENSER		VOLUME		TUBE	
		s	nr	I	II	I	II
	S+DF (20+100)	594/600	99/100	120	120	■	■
	DF (120)	582	97	–	–	■	■
R-1	Thiocyanate Reagent	408	68	–	2500	■	■
R-2	Blank Reagent	216	36	2500	–	■	■
R-3						■	■
R-4						■	■

Fig. 1. Darstellung der Methode zur Bestimmung des Chlorids in Plasma und Serum (C CL 1) mit dem GSA II.

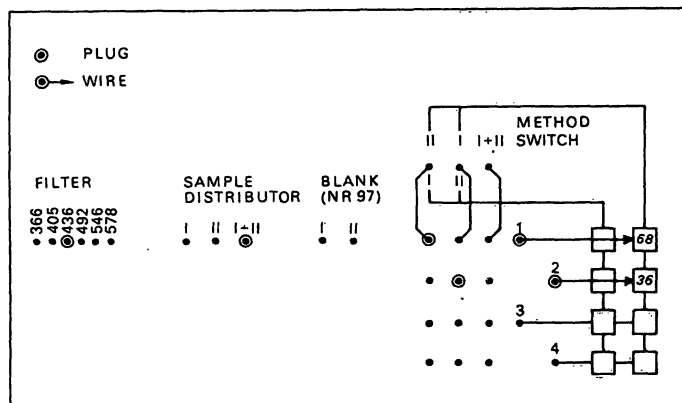


Fig. 2. Methoden-Programm C CL 1.

Konstanten

ϵ (436 nm) = 829,8 l/cm · mol

Proben-Volumen (SV, sample volume) = 20 µl

End-Volumen (FV, final volume) = 2620 µl

Meß-Bedingungen

Im Leerwert-Ansatz I liegen die folgenden End-Konzentrationen vor (mmol/l): Eisen [III]-Nitrat 18,9, Quecksilber [II]-Nitrat 0,071, Salpetersäure 27,7, Chlorid 0–1,145. Der Proben-Ansatz II enthält zusätzlich: Quecksilber [II]-Chlorid 0,194, Quecksilber [II]-Thiocyanat 1,96. Die Reaktionszeit muß zwischen 350 und 500 s liegen.

Berechnung

$$c = dA \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{FV}{SV} \times 10^3 \text{ mmol/l}$$

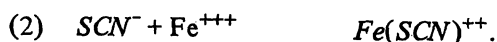
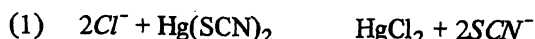
$$c = dA \times 157,9 \text{ mmol/l}$$

$$k = 1579 \text{ (Methoden-Print)}$$

$$n = 1 \text{ (Stellen nach dem Komma)}$$

Resultate und Diskussion

Zur Optimierung der Reagenz-Zusammensetzung Stark vereinfacht spielen sich bei der Rhodanid-Methode die folgenden Reaktionen ab:



Zum Ablauf der Reaktion sind daher auf jeden Fall Quecksilber [II]-Thiocyanat-Ionen, Eisen-Ionen und Säure notwendig.

Quecksilber [II]-Thiocyanat: Die meisten Autoren (1–12) verwendeten eine gesättigte wäßrige Lösung (Löslichkeit bei 25 °C etwa 690 mg im Liter, d. h. etwa 2,5 mmol/l). Gesättigte Lösungen müssen in der absoluten Analytik vermieden werden, da sie schlecht reproduzierbar sind. Auch müßte beim GSA II, in dem die Reagenzien bei 4 °C aufbewahrt werden, mit Ausfällungen gerechnet werden. Wir entschieden uns daher für die von *Clauss* et al. (13) gewählte Konzentration von 2 mmol/l. Bei dieser Konzentration kommt es auf Grund unserer Erfahrung zu keinen Ausfällungen bei 4 °C. Da Plasma unter unseren Meßbedingungen 131fach verdünnt wird (FV/SV = 2620/20), liegt das Chlorid im Ansatz in Konzentrationen um 0,381 (entsprechend 50 mmol/l Probe), 0,763 (100 mmol/l) bis 1,15 mmol/l (150 mmol/l) vor. Bei einer 1,96 mmol/l Quecksilber [II]-Thiocyanat-Lösung im Ansatz liegt somit ein genügender Überschuß für eine 1:1 Reaktion vor.

Eisen-Ionen: Die Eisen-Konzentration ist nicht kritisch, falls das Eisen im Überschuß vorliegt (12). Wird die Konzentration zu stark erhöht, so steigt auch der Leer-Wert entsprechend an. Übereinstimmend verwenden alle Autoren eine Konzentration zwischen 15 und 32 mmol/l.

Säure: Da das Eisen-Salz ionisiert vorliegen muß, kann die Reaktion nur in saurem Milieu ablaufen. Die meisten Autoren (1, 2, 8–11) verwenden Salpetersäure. Nur *Zall* (3) und *Hamilton* (12) bevorzugen Perchlorsäure, da diese eine höhere Absorbanz geben soll. Die Verwendung von Perchlorsäure bringt jedoch mehrere Nachteile mit sich. So werden die Proteine präzipitiert, was allerdings durch einen Zusatz von 3,3 mol/l Harnstoff vermieden werden kann (12). Weiterhin wird der Reaktionsablauf stark von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängig. Schließlich ist mit einer Reaktion des Cholesterins mit dem in stark saurem Milieu vorliegende Eisen-Salz zu rechnen. Aus diesen Überlegungen entschieden wir uns zur Verwendung von Salpetersäure. Wie aus verschiedenen Untersuchungen hervorgeht, liegt die optimale Säure-Konzentration zwischen 20 und 30 mmol/l.

Obwohl der Reaktionsablauf übersichtlich und einfach scheint, zeigten exakte Untersuchungen immer wieder, daß die Methode in dieser vereinfachten Form unbefriedigende Resultate gibt. So gilt bei allen bisher bekannten Modifikationen das *Beer*'sche Gesetz nur für einen sehr kleinen Meß-Bereich (1, 2, 3, 7, 12); die meisten Autoren äußern sich zur Frage der Linearität überhaupt nicht (8–11). Ebenfalls wurde immer wieder beobachtet, daß die Eichkurve nicht durch den Nullpunkt geht (1–3, 11, 12). Die Ursachen dieser Schwierigkeiten liegen sicher zum Teil in der stark variablen Chlorid-Kontamination der zur Reagenzien-Herstellung verwendeten Chemikalien und des Wassers. Es wurde sogar schon vermutet, daß selbst aus der Luft eine Kontamination mit Chlorid erfolgen kann (14). Eine gewisse Verbesserung läßt sich durch zwei Kunstgriffe erzielen: einem

Zusatz von Sublimat und von freien Quecksilber [II]-Ionen.

Sublimat: Nach dem Massenwirkungs-Gesetz verschiebt zugesetztes Sublimat die Reaktion (1) nach links. Wie zuerst *Hamilton* (12) zeigte, läßt sich auf diese Weise die Empfindlichkeit der Methode herabsetzen, bzw. auf die gewünschte Stufe einstellen. Gleichzeitig verbessert ein Zusatz von Sublimat den Linearitätsbereich (12). Für unsere Zwecke erwies sich eine Sublimat-Konzentration von 0,19 mmol/l als zweckmäßig.

Freie Quecksilber [II]-Ionen: Die Beobachtung, daß die Eich-Kurve meist nicht durch den Null-Punkt geht, dürfte in den meisten Fällen auf eine Verunreinigung durch Chlorid-Ionen zurückzuführen sein. *Hamilton* (12) zeigte, daß es durch den Zusatz einer genau dosierten Menge Quecksilber [II]-Ionen, z. B. als Quecksilber [II]-Nitrat gelingt, die Eich-Kurve so zu verschieben, daß sie durch den Null-Punkt geht. Ein Teil der vorhandenen Chlorid-Ionen werden dabei als Quecksilber [II]-Chlorid gebunden und reagieren nicht mehr mit dem Thiocyanat.

Das von uns gewählte Reagenz ist, wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ähnlich demjenigen von *Hamilton* (12), doch verwendeten wir Salpetersäure statt Perchlorsäure und konnten dadurch auf den Harnstoff-Zusatz verzichten.

Tab. 1. Zusammensetzung einiger gebräuchlicher Reagenzien für die Rhodanid-Methode.

Komponenten	<i>Schoenfeld & Lewellen</i> (11)	<i>Hamilton</i> (12)	<i>Clauss</i> et al. (13)	hier
Hg(SCN) ₂ [mmol/l]	2,5	2,5	2,0	1,96
Fe(NO ₃) ₃ [mmol/l]	32	15	20	18,9
Säure: Art	HNO ₃	HClO ₄	HNO ₃	HNO ₃
Konzentration [mmol/l]	25	4600	30	27,7
HgCl ₂ [mmol/l]	–	0,6	0,75	0,19
Hg ⁺⁺ , als Nitrat [mmol/l]	0,9	0,3	–	0,071
Harnstoff [mmol/l]	–	3300	–	–
ε [l/cm · mol]	–	818	634	830
Proben-Verdünnung	31	101	181	131
Proben-Volumen [μl]	500	100	15	20

Optische Eigenschaften des Reaktions-Produktes
Beim vollständigen Ablauf unter geeigneten Bedingungen soll nur ein farbiges End-Produkt, FeSCN⁺⁺, vorliegen (15). Für die Bildung eines 1:1 Komplexes sprechen Untersuchungen mit der Methode der „kontinuierlichen Variation“ (16), sowie Beobachtungen über die Stabilität verschiedener Komplexe (15). Die Art und Zahl der Komplex-Species hängt jedoch sicher von den Reaktions-Bedingungen (3) ab und dürfte auch während der einzelnen Phasen nicht konstant sein.

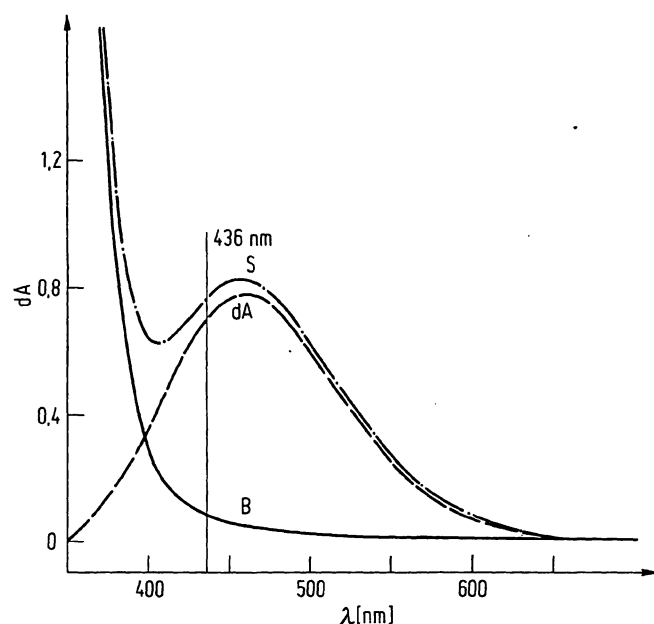


Fig. 3. Absorbanz des Proben-Ansatzes (S), des Leerwert-Ansatzes (B) und der Differenz (dA) als Funktion der Wellenlänge.

Die spektralen Eigenschaften des Reaktions-Produktes unter den vorliegenden Bedingungen sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Absorbanz des Leerwertes ist im sichtbaren Bereich gering und fällt mit zunehmender Wellenlänge gegen Null. Das Maximum des Proben-Ansatzes liegt bei 450 nm, dasjenige des Differenz-Spektrums bei 455 nm. *Clauss et al.* (13) fanden das Maximum bei 460 nm, *Schoenfeld* und *Lewellen* (11) in Perchlorsäure bei 480 nm.

Bei der Adaption der Methode für den GSA II stellte sich die Frage, ob die Messung besser bei 436 nm oder bei 492 nm durchgeführt werden sollte. Theoretisch hätte die Messung bei 492 nm gewisse Vorteile, indem eine möglicherweise vorhandene Trübung sich weniger stark auswirken würde und zudem der Leerwert etwas kleiner sein dürfte (Abb. 3). Andererseits liegt die Absorbanz bei 492 nm etwa 20% tiefer als bei 436 nm. Experimentell konnten wir jedoch keine Unterschiede in Bezug auf die Abweichung vom Null-Punkt und den linearen Meßbereich feststellen. Wir geben daher der empfindlicheren Messung bei 436 nm den Vorzug.

Es sei hier noch erwähnt, daß die Absorbanz des Reaktions-Produktes eine Temperatur-Abhängigkeit aufweist: pro 10 °C steigt die Absorbanz um 7–8% (12). Es muß daher bei der Messung eine exakte Einhaltung der Temperatur gefordert werden.

Zur Reaktions-Kinetik

Nach der Festlegung der Reagenz-Zusammensetzung und der Meß-Wellenlänge wurde die Farbentwicklung als Funktion der Reaktionszeit untersucht. Durch Verschieben des Reagenz-Dosierers wurde die Reaktionszeit variiert. Ein typisches Experiment ist in Abbildung 4 dargestellt. Es zeigt sich, daß keine einfachen kinetischen

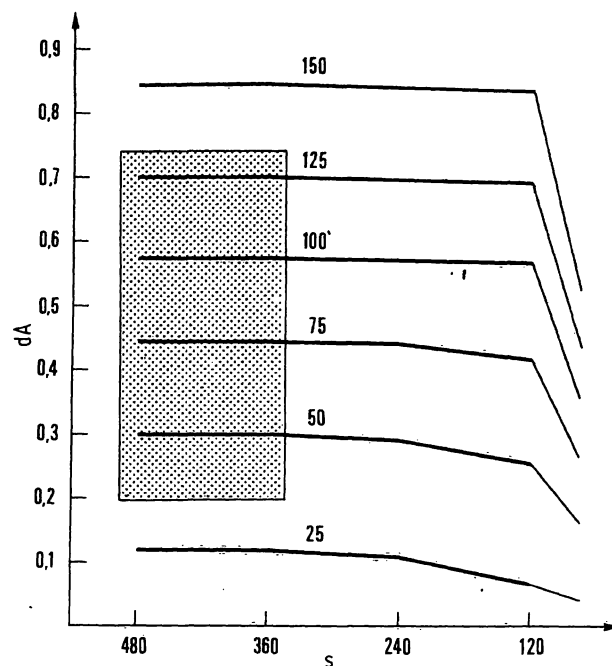


Fig. 4. Absorbanz als Funktion der Reaktionszeit (Zeit 0 s entspricht der Messung im Photometer) und der Chlorid-Konzentration (mmol/l). Der lineare Meß-Bereich ist hervorgehoben.

Verhältnisse vorliegen, sondern daß der Reaktionsablauf offenbar u. a. durch die Chlorid-Konzentration beeinflusst wird. Bei relativ hohen Konzentrationen, etwa zwischen 100 und 150 mmol/l beträgt die Farb-Entwicklung bereits nach 120 s über 98%. Mit abnehmender Chlorid-Konzentration verzögert sich die Reaktion nicht nur absolut, sondern vor allem relativ.

Aus diesen Untersuchungen geht bereits hervor, daß

1. eine Linearität über den ganzen Meß-Bereich kaum erzielt werden kann und
2. Angaben über die Absorptivität immer nur für eine bestimmte Chlorid-Konzentration und Reaktions-Dauer Gültigkeit haben.

Die Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes

Die folgenden Untersuchungen über den Meßbereich wurden mit Referenz-Material des National Bureau of Standards (Standard Reference Material 999, Kalium-Chlorid, Reinheit 99,9%) durchgeführt. Das Material wurde bei 110 °C bis zur Gewichts-Konstanz getrocknet und jede Verdünnung einzeln eingewogen. Die Reaktionszeit betrug bei allen Versuchen über 350 s. Ein typisches Experiment ist in Tabelle 2 dargestellt. Offensichtlich geht die Kurve nicht durch den Null-Punkt und weicht auch sonst systematisch von einer Geraden ab. Hingegen zeigt sich, daß im Bereich zwischen 30 und 130 mmol/l die Abweichung weniger als 2% beträgt. Wir haben daher die Regression für diesen Bereich ermittelt und erhielten

$$c(\text{mmol/l}) = -0,018 + 158,1 \, dA,$$

Tab. 2. Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes. N = 10.

Chlorid, eingewogen [mmol/l]	Chlorid, gefunden \bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	V. K. [%]	Ab- weichung [mmol/l]
0	1,68	0,2261	13,46	+ 1,68
10	4,23	0,3156	7,46	- 5,77
20	15,07	0,2821	1,87	- 4,93
30	28,00	0,5770	2,06	- 2,00
40	40,09	0,4029	1,00	+ 0,09
50	51,81	0,4192	0,81	+ 1,81
60	62,48	0,2744	0,44	+ 2,48
70	72,34	0,5438	0,75	+ 2,34
80	82,17	0,6222	0,76	+ 2,17
90	91,45	0,4858	0,53	+ 1,45
100	100,02	0,4517	0,45	+ 0,02
110	109,00	0,5117	0,47	- 1,00
120	118,03	0,3615	0,31	- 1,97
130	127,39	0,7121	0,56	- 2,61
140	136,52	0,6767	0,50	- 3,48
150	145,59	0,5692	0,39	- 4,41

mit einer Standard-Abweichung von 0,0525 mmol/l und einem Korrelations-Koeffizienten von 1,0 (5 Stellen). Eine graphische Darstellung der Abweichung von der Linearität gibt Abbildung 5. Zum Vergleich haben wir in dieser Abbildung auch noch die Abweichung eingezeichnet, wie sie mit dem Reagenz von *Clauss* et al. (13) erhalten wurde. Im klinisch wichtigsten Meßbereich, nämlich zwischen 90 und 110 mmol/l beträgt die Abweichung weniger als 1%.

Wie bereits oben erwähnt wurde, hängt die Absorbanz von mehreren Variablen ab, so von der Chlorid-Konzentration, der Prozeßzeit und noch anderen Faktoren wie vor allem Verunreinigungen durch Chlorid. Wir definieren daher in der vorliegenden Arbeit die molare Absorptivität willkürlich für eine Chlorid-Konzentration von 100 mmol/l und eine Prozeßzeit von 350 bis 500 s

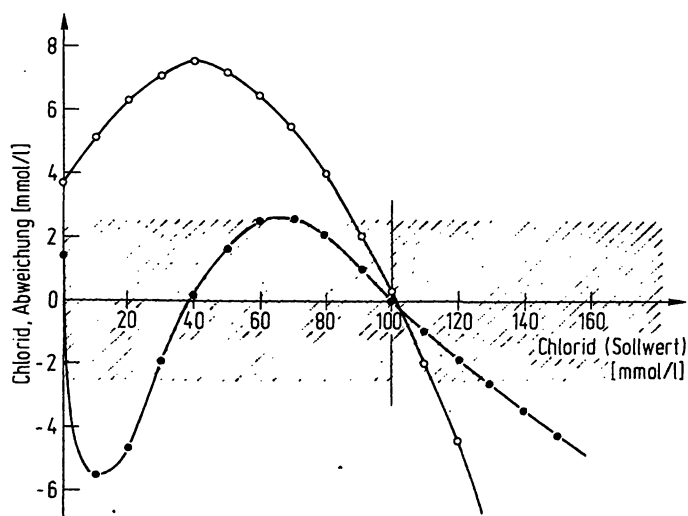


Fig. 5. Fehler-Darstellung der Methode. Auf der X-Achse ist die Soll-Konzentration in mmol/l dargestellt, auf der Y-Achse die Abweichung der Meß-Werte von den Soll-Werten. Verwendet wurden die Daten aus Tab. 2. ○ — Reagenz nach *Clauss* et al. (13), ● — unter Methodik beschriebenes Reagenz.

unter den Bedingungen des GSA II (Temperatur, Mischen, usw.). Unter diesen Einschränkungen fanden wir einen Wert von 829,8 l/cm · mol. Im Vergleich dazu geben *Clauss* et al. (13) einen Wert von 634 l/cm · mol und *Schoenfeld* und *Lewellen* (11) von 480 l/cm · mol.

Zur Wahl des Leerwertes

Da bei der Chloridbestimmung mit einer Störung durch Lipämie, Hämolyse und Bilirubin zu rechnen ist (12, 13), muß auf jeden Fall ein Proben-Leerwert mitgeführt werden. Dabei drängt sich ein Reagenz auf, das kein Thiocyanat, jedoch Eisen-Ionen enthält. Es muß nämlich damit gerechnet werden, daß die große Zahl von Metaboliten und Medikamenten, die mit Eisen-Salzen reagieren (FeCl₃-Test) interferieren, falls keine Korrektur mit einem eisenhaltigen Leerwert vorgenommen wird. Aus ähnlichen Überlegungen wird auch beim AutoAnalyzer empfohlen, einen zweiten Kanal mit einem Leerwert-Reagenz einzusetzen (11).

Spezifität

Wie aus dem Prinzip der Methode hervorgeht, kann diese nicht spezifisch sein, sondern erfaßt neben Chlorid auch Bromid, Jodid, Fluorid und Cyanid (1, 11). Beim Cyanid, Fluorid und Jodid sind die Konzentrationen in Körperflüssigkeiten stets so gering, daß dies keine Rolle spielt. Hingegen kann es bei einer Überdosierung mit Bromiden zu falsch erhöhten Resultaten kommen; dies gilt allerdings auch für die meisten anderen im klinischen Laboratorium verwendeten Methoden. Wichtig ist vielleicht noch, darauf hinzuweisen, daß mit Fluoriden zur Glycolyse-Hemmung behandeltes Blut nicht für Chlorid-Bestimmungen verwendet werden kann. Nur von theoretischem Interesse ist die Reaktion mit Thiosulfat, Ferrocyanid und Ferricyanid (2).

Eine positive Reaktion mit dem Rhodanid-Reagenz geben alle Metabolite und Medikamente, die eine positive Eisen-Chlorid-Reaktion geben, also u. a. Acetylsalicylat und *p*-Aminosalicylat (11). Das Mitführen eines Leerwertes eliminiert diese Störungen. Interferenzen sind ferner beim Vorliegen einer Hämolyse, Bilirubin und bei Trübungen beobachtet worden (11–13). Wie aus den Tabellen 3–5 hervorgeht, spielen diese Stör-Faktoren beim GSA II keine Rolle. Da bekannt ist, daß das Chlorid im Plasma zum Teil an Proteine gebunden vorliegt (17, 18), untersuchten wir auch den Effekt verschiedener Protein-Konzentrationen auf die Chlorid-Bestimmung. Wie Tabelle 6 zeigt, hat die Protein-Konzentration keinen Einfluß auf die Resultate der Chlorid-Bestimmung. Dies im Gegensatz zu Messungen mit ionenselektiven Elektroden.

Beeinflussung

Trotz mehrerer Versuche ist es uns mit den Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs (19), der Glucose (20) und des Bilirubins (21) nie gelungen, beim GSA II eine

Verschleppung nachzuweisen. Auch bei der Chlorid-Bestimmung verliefen Versuche mit einem Konzentrations-Gefälle von 150 auf 10 mmol/l negativ.

Tab. 3. Störungen durch Hämolyse. Ein Erythrocyten-Konzentrat aus etwa 10 ml Vollblut wurde mit demin. Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Nach Gefrieren und wieder Auftauen wurde das Präparat 10 min bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Seronorm (118) so verdünnt, daß Verdünnungen zwischen 21 und 1001 entstanden. N = 5.

Hämoglobin		Chlorid		V. K. [%]
[mmol/l]	[mg/100 ml]	\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	
0	0	99,14	0,833	0,84
12,4	20	98,64	0,997	1,01
19,9	32	98,48	1,543	1,57
24,8	40	99,00	0,583	0,59
47,2	76	99,24	0,522	0,53
70,1	113	98,58	0,705	0,72
93,7	151	98,80	0,529	0,54
117	188	98,42	0,311	0,32
231	373	98,50	0,561	0,57
287	463	98,24	3,300	3,36
562	905	96,04	1,071	1,12

Tab. 4. Beeinflussung der Chlorid-Bestimmung durch Bilirubin. (N = 4). Eine Verdünnungsreihe von Bilirubin (BDH) in 0,1 mol/l Na₂CO₃ wurde als Lösungsmittel für Seronorm (Nr. 118) verwendet.

Bilirubin		Chlorid	
[μ mol/l]	[mg/100 ml]	\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]
41,0	2,39	91,58	1,193
54,9	3,21	91,88	0,613
119,4	6,98	92,50	0,294
199,2	11,65	92,13	0,880
280,9	16,43	90,68	1,109
355,6	20,82	91,63	0,607

Tab. 5. Der Einfluß von Trübungen auf die Chlorid-Bestimmungen. „Vor Klärung“ heißt nach einer 5 min Zentrifugation bei 15 000 g, „nach Klärung“ nach einer 2,20 min Zentrifugation bei 15 000 g.

Patient	Triglyceride	Cholesterin	Chlorid	
	[mg/100 ml]	[mg/100 ml]	vor Klärung [mmol/l]	nach Klärung [mmol/l]
S. V.	420	268	85,1	86,6
M. V.	307	179	91,1	88,5
S. O.	458	298	94,4	98,8
K. B.	990	386	104,2	98,8
L. W.	1812	555	94,5	96,8
S. A.	585	256	86,4	87,4
P. E.	3510	323	96,3	99,9
T. D.	981	248	89,2	89,7
B. E.	390	1028	98,0	97,9
S. E.	303	324	101,2	98,8

Tab. 6. Einfluß der Protein-Konzentration auf die Chlorid-Bestimmung. Es wurde zunächst eine Lösung mit einer Albumin-Konzentration von 100 g/l hergestellt. Anschließend wurde Kalium-Chlorid eingewogen und in dieser Lösung gelöst. N = 10. Die angeführten Sollwerte wurden auf die Nicht-Linearität korrigiert. N = 10.

Chlorid, eingewogen [mmol/l]	Chlorid, Soll-Wert [mmol/l]	Chlorid, mit Protein-Zusatz		V. K. [%]
		\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	
0,0	0,17	0,18	0,0917	50,9
20,0	15,07	14,44	0,6044	4,19
45,0	45,95	44,48	0,6797	1,53
67,5	69,43	69,88	0,7326	1,04
90,0	91,45	91,86	0,6340	0,69
112,5	111,72	111,76	0,7032	0,63
135,0	131,95	131,93	0,5726	0,39
150,0	145,59	144,98	0,3844	0,29

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch eine Analyse einer Reihe kommerzieller Kontroll-Seren überprüft. Einige Resultate sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Resultate lagen zum größten Teil zwischen 98 und 102% der deklarierten Werte, die Variations-Koeffizienten schwanken zwischen 0,44 und 1,16%.

Präzision

Wie schon bei früheren Untersuchungen (21), läßt sich auch hier deutlich ein Specimen-Fehler nachweisen. Die kleinsten Streuungen werden auch bei der Chlorid-Bestimmung mit wäßrigen Lösungen beobachtet (vgl. Tab. 2 u. a.); der Variations-Koeffizient lag zwischen 0,4 und 0,8%. Bei gelösten Kontroll-Seren liegen die entsprechenden Werte zwischen 0,6 und 1,2%, während sie bei lyophilisierten Specimen zwischen 0,8 und 1,5% liegen. Auf die grundsätzliche Bedeutung dieser Beobachtung haben wir schon früher hingewiesen.

Die Präzision aller bisher mit dem GSA II untersuchten Methoden folgt, wie auch aus Abbildung 6 hervorgeht, bestimmten Gesetzmäßigkeiten:

1. Die Standard-Abweichung s ist eine Funktion der Absorbanz. Sie ist am kleinsten bei Absorbanz Null und steigt mit zunehmender Absorbanz, bzw. Konzentration.
2. Der Variations-Koeffizient ist umgekehrt bei einer Absorbanz von Null am größten und fällt mit steigender Absorbanz gegen einen Grenzwert. Theoretisch sollte der Variations-Koeffizient bei Null unendlich groß sein. Die relativ kleinen Variations-Koeffizienten beim Nullwert bei der Bestimmung des Chlorids sind darauf zurückzuführen, daß die Eich-Kurve nicht exakt durch Null geht.

Praktische Erfahrungen

Die vorliegende Methode wird seit dem Februar 1973 routinemäßig in unserem Laboratorium durchgeführt, wobei wir täglich etwa 100 Chlorid-Bestimmungen

Tab. 7. Bestimmung der Chlorid-Konzentrationen in einigen kommerziellen Kontroll-Specimen (N = 10). L lyophilisiert, F flüssig.

Specimen	Art	Deklarierte Werte			Gefundene Werte			Gefunden Deklariert · 100
		Methode	\bar{x} [mmol/l]	$\pm 2 s$ [mmol/l]	\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	V. K. [%]	
Kontroll-Scrum (C 0431)	F	Titrimetrie (1)	98,0		93,61	0,519	0,554	95,52
Lab-Trol (LT-40 A-Z)	F	Titrimetrie (1)	100,7	100,01–101,39	99,14	0,698	0,704	98,45
		Potentiometrie (2)	99,9	98,8 –101,0				99,24
		Auto-Analyzer (4)	99,4	97,3 –101,5				99,74
Moni-Trol II (PTD-32, A, B)	L	Titrimetrie (1)	114,6	113,0 –116,2	113,55	1,312	1,155	99,08
		Potentiometrie (2)	113,8	112,9 –114,7				99,78
		Auto-Analyzer (4)	114,6	112,5 –116,5				99,17
		SMA 12/60	113,0	108,4 –117,6				100,49
Precinorm S (102)	F	Titrimetrie (1)	103,0	97,9 –108	99,83	0,482	0,483	96,92
		Potentiometrie (2)	99,0	94,1 –104				100,84
		Coulometrie (3)	99,3	95,3 –103				100,53
Q-Pack (0369R002A1)	F	Titrimetrie (1)	104	101 –107	104,01	0,544	0,523	100
		Potentiometrie (2)	104					100
		SMA 12/60	104					100
Seronorm (120)	L	Neutronen-Aktivierung	102,8		102,57	0,473	0,461	99,78
		Potentiometrie (2)	100,9					101,66
		Auto-Analyzer (4)	101,0					101,55
Versatol-Pediatric (0586060)	L	?	101,0	97 –104	98,07	0,432	0,440	97,10

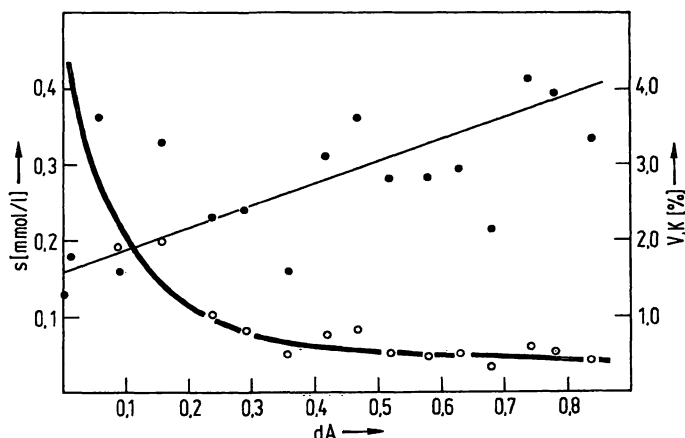
(1) Titrimetrie: *Schales, O. & Schales, S. S.* (1941), *J. Biol. Chem.* 140, 879.(2) Potentiometrie: *Seligson, D., McCormick, G. J. & Sleeman, K.* (1958), *Clin. Chem.* 4, 159.(3) Coulometrie: *Cotlove, E., Trantham, H. V. & Bowman, R. L.* (1958), *J. Lab. Clin. Med.* 51, 461.(4) Auto-Analyzer (N-5b I/II): *Zall, D. M., Fischer, D. & Garner, M. O.* (1956), *Analyt. Chem.* 28, 1665.

Fig. 6. Präzision der Chlorid-Bestimmung. Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 2. Ordinate links: Standard-Abweichung (●—●) Ordinate rechts: Variations-Koeffizient (○—○) in % (n = 10). Abszisse: Differenz der Absorbanz zwischen Proben- und Leerwert-Ansatz (dA).

durchführen. Einige Daten über die Repetierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Methode sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Wie aus diesen Daten hervorgeht, lagen die Variations-Koeffizienten bei diesem lyophilisierten Kontroll-Serum zwischen 0,4 und 1,4%, wobei kein Unterschied zwischen der Streuung in Serie (Repetierbarkeit) und der Streuung von Tag zu Tag (Reproduzierbarkeit) nachzuweisen ist.

Ein praktisch wichtiges Problem ist die Gefahr einer Kontamination der Reagenzien mit Chlorid. Dies tritt

Tab. 8. Resultate der Qualitäts-Kontrolle während einer Woche (Reproduzierbarkeit). Täglich wurde ein neues Fläschchen Monitrol II (Dade) gelöst und 10 Bestimmungen durchgeführt (Repetierbarkeit).

	\bar{X} [mmol/l]	s [mmol/l]	V. K. [%]
13.10	110,0	1,50	1,37
15.10	111,8	0,95	0,85
16.10	109,8	1,04	0,95
17.10	108,5	0,42	0,40
18.10	110,0	1,29	1,18
19.10	111,5	0,43	0,39
Total	110,26	1,210	1,09

vor allem dann auf, wenn beim Einfüllen neuer Reagenzien-Flaschen der Stutzen mit bloßen Händen verschmutzt wird. Es müssen daher beim Reagenz-Wechsel stets Kunststoff-Handschuhe getragen werden. Grobe Verunreinigungen dieser Art lassen sich meist an der Verfärbung des Reagenz erkennen. Sie manifestieren sich auch sofort in einer starken Erhöhung der Werte bei der Null-Kontrolle.

Rekalibrierung beim GSA II

Bei den bisher für den GSA II publizierten Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs (19), der Glucose (20) und des Bilirubins (21) war es nie notwendig, nach der Initial-Eichung (Methoden-Print) eine Rekalibrierung vorzunehmen.

men. Wir berichteten im März 1973, daß dies auch beim Chlorid nicht notwendig sei (22). Nach einigen Monaten zeigte sich jedoch, daß sehr langsam ein Drift auftreten kann, der eine Rekalibrierung notwendig macht. Zur Drift-Kontrolle muß allerdings eine wäßrige Chlorid-Lösung mitgeführt werden, da die Streuung der kommerziellen Kontroll-Seren zur Überwachung dieser Funktion zu groß ist. Wir betrachteten eine Abweichung von $\pm 1\%$ vom Soll-Wert (100 mmol/l) als Alarm-Grenze, eine Abweichung von 1,5% als Aktions-Grenze. Bei kommerziellen Kontroll-Seren, vor allem bei lyophilisierten Specimen, liegen solche Schwankungen in Form des Specimen-Fehlers vor, so daß diese nicht zu Kontroll-Zwecken verwendet werden dürfen. Es empfiehlt sich daher, täglich bei der Qualitäts-Kontrolle neben der Null-Kontrolle noch eine wäßrige Lösung bekannter Konzentration mitzuführen. Eine weitergehende Qualitäts-Kontrolle erübrigt sich. Die Drift-Abweichungen lassen sich schon früh erkennen. Wir mußten bisher etwa einmal pro Monat eine Rekalibrierung vornehmen. Das Prinzip der Rekalibrierung sei kurz erläutert.

Es seien

- f der Faktor, mit dem die Absorbanz multipliziert wird, um eine Konzentration zu erhalten,
- k die Methoden-Konstante, die als Hardware im Methoden-Print (gedruckte Schaltung) vorliegt,
- n die Zahl der Stellen nach dem Komma, die durch den Vor-Druck auf der Bestell-Karte gegeben sind und
- v eine Variable, die dem Quotienten aus Erwartungs-Wert (C_{exp}) und Beobachtungs-Wert (C_{obs}) entspricht und am Potentiometer des Methoden-Prints eingestellt werden kann.

Die Berechnung des Resultates erfolgt beim GSA II nach folgender Formel:

$$c = dA \times f, \text{ wobei}$$

$$f = k \times v \times 10^{-n}.$$

Ist v gleich 1, d. h. Erwartungs-Wert/Beobachtungs-Wert = 1, so beträgt die Potentiometer-Einstellung 400 Skalenteile. Weicht der Beobachtungs-Wert signifikant vom Erwartungs-Wert ab, so berechnet man, wie dies Tabelle 9 zeigt, v. Mit Hilfe einer Formel oder von Tabellen kann auf Grund der bekannten alten Skalen-Einstellung und des v die neue Skalen-Einstellung ermittelt werden.

Tab. 9. Auszug aus der Qualitäts-Kontrolle. Es sind nur diejenigen Daten angeführt, an denen eine Re-Kalibrierung notwendig war.

Datum	Erwartungs-Wert C_{exp} [mmol/l]	Beobachtungs-Wert C_{obs} [mmol/l]	v $\frac{C_{exp}}{C_{obs}}$	Potentiometer Skalen- Teile	Faktor f
16. 4.	100,0	100,0	1,000	400	157,9
17. 5.	100,0	98,6	1,024	491	161,7
24. 8.	100,0	101,5	0,986	434	159,4
21. 9.	100,0	102,5	0,975	343	155,4
2. 10.	100,0	98,4	1,028	452	159,8

Durch die neue Skalen-Einstellung am Potentiometer wird v wieder gleich 1. Diese Korrektur kann in 1–2 min vorgenommen werden.

Die Ursachen für diese unsystematischen Schwankungen konnten wir bisher noch nicht ermitteln. Sie liegen aber vermutlich bei Chlorid-Verunreinigungen der Chemikalien, des Wassers und möglicherweise sogar Luft (14). Der Drift tritt sehr langsam ein und es war uns nur selten möglich, einen direkten Zusammenhang zwischen der Reagenzien-Charge und den Abweichungen festzustellen. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß es durch eine Verbesserung der Reagenzien-Herstellung und Aufbewahrung gelingt, diese Fehlerquelle zu eliminieren.

Immerhin muß darauf hingewiesen werden, daß diese Abweichungen nur erkannt werden können, weil der GSA II eine außerordentlich hohe apparative Präzision aufweist. Bei Instrumenten, bei denen die apparative Präzision oberhalb derjenigen der Kontroll-Specimen liegt, d. h. über 1,5% beträgt, sind solche Veränderungen gar nicht feststellbar.

Danksagung

Wir danken Fr. H. Dauwalder, Fr. M. Rakebrandt, Fr. M. Lehmann und Herrn Dr. C. Tschanz für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Ausarbeitung dieser Methode.

Literatur

- Iwasaki, I., Utsumi, S. & Ozana, T. (1952), Bull. Chem. Soc. Japan 25, 226.
- Iwasaki, I., Utsumi, S., Hagino, K. & Ozawa, T. (1956), Bull. Chem. Soc. Japan 29, 860–864.
- Zall, D. M., Fischer, D. & Garner, M. Q. (1956), Anal. Chem. 28, 1665–1668.
- Astm Standards, Part we, (Nov. 1969), Water, atmospheric analysis, p. 29–31.
- Demitt, T. F. (1962), U. S. A. E. C. rept. HW-74333.
- Florence, T. M. & Farrar, Y. J. (1971), Anal. Chim. Acta 54, 373–377.
- Rodabaugh, R. D. & Upperman, G. T. (1971), Anal. Chim. Acta 54, 373–377.
- Skeggs, L. T. (1957), Amer. J. Clin. Pathol. 28, 311.
- Skeggs, L. T. & Hochstrasser, H. (1964), Clin. Chem. 10, 918.
- Kenny, M. A. & Cheng, M. H. (1964), Clin. Chem. 18, 352–354.

11. Schoenfeld, R. G. & Lewellen, C. J. (1964), *Clin. Chem.* 10, 533-539.
12. Hamilton, R. H. (1966), *Clin. Chem.* 12, 1-17.
13. Clauss, I., Graf, E., Ringhardt, I. & Schmitt, A. (1969), *Beitr. z. klin. Chemie*, Heft 5, (Bodenseewerk Perkin-Elmer).
14. Bergmann, J. G. & Sanik, J. (1957), *Anal. Chem.* 29, 241-243.
15. Elsheimer, H. N. & Kochen, R. L. (1966), *Anal. Chem.* 38, 145-147.
16. Gould, R. K. & Vosburgh, W. C. (1942), *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 1630.
17. Scatchard, G., Scheinberg, H. I. & Armstrong, S. H. (1950), *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 535-542.
18. Dahms, H., Rock, R. & Seligson, D. (1968), *Clin. Chem.* 14, 859-970.
19. Richterich, R. & Küffer, H. (1973), *diese Z.* 11, 553-564.
20. Richterich, R., Küffer, H. & Lorenz Erica, (1974), *diese Z.* 12, 5-13.
21. Küffer, H., Richterich, R., Peheim, E. & Colombo, J. P. (1974), *diese Z.* 12, 294-302.
22. Richterich, R. (1973), *Aerztl. Lab.* 19, 300-305.

Dipl.-Biochem. H. Küffer
 Biochemistry
 Research & Development
 Greiner Electronic Ltd.
 CH-4900 Langenthal
 Switzerland

